

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Šárka Husáková

Vliv spánku a cirkadiánního systému na propustnost hematoencefalické bariéry

The impact of sleep and circadian system on the blood-brain barrier permeability

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Eva Filipovská

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2021

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala mé školitelce, Mgr. Evě Filipovské, za trpělivost, ochotu a rady při psaní této bakalářské práce. Velké díky patří také mé rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Hematoencefalická bariéra (HEB) odděluje oběhový systém a mozkovou tkáň. Udržuje homeostázu mozku a reguluje transport látek mezi mozkovou tkání a krví, čímž je zabráněno vstupu potenciálně toxických látek do CNS. Jednotlivé buňky podílející se na stavbě HEB, stejně jako většina buněk v těle, obsahují cirkadiánní hodiny, které přispívají k jejich správnému fungování. Cirkadiánní systém pomáhá organismům načasovat behaviorální a fyziologické procesy s periodou 24 hodin. Organismy vykazují cirkadiánní rytmy např. v tělesné teplotě, v uvolňování určitých hormonů, a především v cyklu spánku a bdění. Spánek zajišťuje metabolickou homeostázu a je nezbytný pro správné fungování organismu. V nedávných studiích bylo prokázáno, že cirkadiánní rytmy a spánek se podílí na regulaci HEB. Příjem cizorodých látek a jejich transport zpět do krevního řečiště je řízen cirkadiánními hodinami. Narušení cirkadiánního systému či spánková deprivace působí negativně na strukturu bariéry. Vede ke zvýšení propustnosti HEB a oslabuje homeostatické mechanismy pomáhající odplavit metabolity a škodlivé látky z mozkové tkáně, což může přispívat k neurozánětu a neurodegenerativním onemocněním.

Klíčová slova:

cirkadiánní systém, hodinové geny, hematoencefalická bariéra, spánek, spánková deprivace

Abstract

The blood-brain barrier (BBB) separates the circulatory system and brain tissue. It maintains homeostasis in the brain and regulates the transport of substances between brain tissue and blood, which prevents entry of potentially toxic substances into the central nervous system. The cells of the BBB, like most cells in the body, contain a circadian clock that contributes to their proper function. The circadian system helps organisms to schedule behavioral and physiological processes over a period of 24 hours. Organisms show circadian rhythms, for example, at body temperature, in the release of certain hormones, and especially in the sleep-wake cycle. Sleep ensures metabolic homeostasis and is essential for the proper functioning of the body. Recent studies have shown that circadian rhythms and sleep are involved in the regulation of BBB. The intake of foreign substances and their transport back into the bloodstream is controlled by circadian clock. Disruption of the circadian system or sleep deprivation has a negative effect on the barrier structure. It increases the permeability of HEB and impairs homeostatic mechanisms that help to efflux metabolites and harmful substances from brain tissue, which can contribute to neuroinflammation and neurodegenerative diseases.

Key words:

circadian system, clock genes, blood-brain barrier, sleep, sleep deprivation

Seznam zkratek

A β	amyloid β
ABC	ATP-binding cassette
ATP.....	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
AQP4.....	aquaporin-4
BMAL1	brain and muscle ARNT-like protein-1
CCGs.....	hodinami řízené geny (clock controlled genes)
CK1.....	kasein kináza 1 (casein kinase 1)
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CNS	centrální nervový systém
COX-2.....	cyklooxygenáza-2
CRY.....	cryptochrome
CSR.....	chronic sleep restriction
CT.....	circadian time
GLUT1	glukózový transportér (glutamate transporter 1)
HEB	hematoencefalická bariéra
JAMs	junctional adhesion molecules
Mdr	multidrug resistance
Mg.....	hořčík (magnesium)
MMP-9.....	matrix-metaloproteináza 9
NOS.....	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)
PDGFR β	platelet derived growth factor receptor β
PER.....	period
PG	perineurální glie
Pgp.....	P-glykoprotein
REM	rapid eye movement
ROR.....	retinoic acid-related orphan receptor
SCN	suprachiasmatická jádra (suprachiasmatic nuclei)
SPG.....	subperineurální glie

TJs těsné spoje (tight junctions)

TRPM7 transient receptor potential cation channel subfamily M member 7

ZO zonula occludens

Obsah

1. Úvod	1
2. Cirkadiánní systém	2
2.1 Organizace cirkadiánního systému	2
2.2 Synchronizace cirkadiánního systému	3
2.3 Molekulární mechanismus hodin	3
2.3.1 Zpětnovazebné smyčky	3
2.3.1.1 Hodinami kontrolované geny	4
2.4 Periferní oscilátory	5
2.5 Melatonin	6
3. Hematoencefalická bariéra	6
3.1 Struktura hematoencefalické bariéry	7
3.1.1 Endoteliální buňky	8
3.1.1.1 Transport mezi endoteliálními buňkami	8
3.1.2 Pericyty	8
3.1.3 Astrocyty	9
3.2 Transportéry hematoencefalické bariéry	9
4. Regulace hematoencefalické bariéry cirkadiánními rytmy	10
4.1 Vliv melatoninu na propustnost hematoencefalické bariéry	12
5. Spánek	12
5.1 Regulace hematoencefalické bariéry spánkem	13
5.1.1 Spánková deprivace	13
5.1.1.1 Omezení REM fáze spánku	14
5.2.1 Vztah spánku a vezikulárního transportu přes hematoencefalickou bariéru	14
6. Role spánku při onemocněních centrální nervové soustavy	15
6.1 Clearance pomocí glymfatického systému	15
6.2 Hromadění amyloidu- β a proteinu Tau	16
7. Závěr	17
8. Použitá literatura	18

1. Úvod

Vnitřní prostředí mozku savců odděluje od krevního řečiště hematoencefalická bariéra (HEB). Propustnost této bariéry regulují mimo jiné také cirkadiánní rytmy. Všechny organismy vykazují tento endogenní časový systém, procesy periodicky se opakující každých cca 24 hodin. Cirkadiánní rytmy ovlivňují správné fungování všech orgánových soustav a mají velký dopad na náš každodenní život.

Tato práce je zaměřena na vliv cirkadiánních rytmů a jejich fyziologických výstupů, jako je spánek či výlev hormonu melatoninu, na regulaci hematoencefalické bariéry. Nedávné studie ukazují na přítomnost hodinového mechanismu v buňkách tvořících HEB. Tyto buněčné hodiny periodicky ovlivňují transport látek mezi mozkovou tkání a krevním oběhem v průběhu 24 hodin. Také dostatečný spánek je nezbytný pro udržení integrity HEB. Narušení vnitřního časového systému a spánková deprivace mohou významně ovlivnit funkci HEB a následně vést k poškození vnitřního prostředí mozkové tkáně. Pochopení této problematiky může pomoci k objasnění některých patologií CNS.

První část mé práce shrnuje základní poznatky o cirkadiánním systému. Historii, molekulární mechanismy, centrální a periferní oscilátory. Ve druhé části je popsána struktura a funkce HEB, její jednotlivé složky a transportní systémy. Poslední část je věnována nedávným poznatkům, jak spánek a cirkadiánní rytmy regulují transport látek přes HEB. Dále jak spánková deprivace ovlivňuje propustnost HEB a jak tyto faktory souvisí s onemocněním centrální nervové soustavy.

2. Cirkadiánní systém

Pozorování denních rytmů bylo zaznamenáno již ve středověku, ačkoli jejich původ byl z počátku zpochybňován. V 18. století francouzský astronom Jean-Jacques d'Ortous de Mairan pozoroval pohyby listů Mimosy. Přes den byly listy rozevřené, přes noc sklopené. Pohyby listů nevymizely, ani po následném umístění rostliny do stálé tmy. Tímto objevem byla poprvé nastíněna endogenní povaha cirkadiánních hodin (Fuhr et al. 2015).

Většina organismů žijících na Zemi je vystavena prostředí měnícímu se během 24 hodin. V důsledku adaptace na tyto změny se u organismů vyvinul vnitřní časový systém, který pomáhá načasovat fyziologické a behaviorální procesy na optimální dobu. Významné cirkadiánní rytmy vykazují organismy například v cyklu spánku a bdění, v tělesné teplotě, v hladinách některých hormonů i v kognitivních funkcích. Tento hodinový systém nazýváme cirkadiánní (z lat. „circa“ – přibližně a „diem“ – den), kvůli jeho periodě trvající přibližně 24 hodin (Vitaterna et al. 2001).

Lidský cirkadiánní systém se může lišit individuální délkou periody, tento stabilní rys je označován jako chronotyp. Byly studovány dva typy: „skřivani“ a „sovy“ (ranní a večerní typ). „Skřivani“ se brzy probouzí, brzy chodí spát a ráno mívají více energie. Naopak „sovy“ zůstávají vzhůru dlouho do noci, později vstávají a jejich energie se zpravidla zvyšuje s pozdním večerem (Cavallera and Giudici 2008; Kripke et al. 2008).

2.1 Organizace cirkadiánního systému

Cirkadiánní systém savců je organizován hierarchií oscilátorů. Centrální oscilátor se nachází v suprachiasmatických jádrech (SCN) nad překřížením optických nervů v oblasti předního hypotalamu. Řídí periferní oscilátory nacházející se jak v ostatních oblastech mozku, tak ve všech periferních orgánech (Vitaterna et al. 2001; Suburo and Pellegrino de Iraldi 1969).

Role SCN jako centrálního oscilátoru byla dokázána pokusem, ve kterém byla provedena oboustranná léze jader, v důsledku čehož došlo k celkové ztrátě rytmicity všech fyziologických procesů (Stephan and Zucker 1972). Transplantací SCN byla rytmicita organismu opět obnovena (Ralph et al. 1990).

2.2 Synchronizace cirkadiánního systému

Faktory, které jsou schopné synchronizovat cirkadiánní periodicitu na přesných 24 hodin se nazývají Zeitgebery. Nejúčinnějším synchronizátorem hodin je světlo, ale fázi cyklu mohou modulovat i další faktory, jako je např. teplota (Vitaterna et al. 2001).

Suprachiasmatická jádra získávají informace o světelných podmínkách ve vnějším prostředí pomocí přímého spojení s fotosenzitivními gangliovými buňkami v sítnici oka, které obsahují foton pigment melanopsin (Hattar et al. 2002). Tato dráha se nazývá retinohypotalamický trakt (Hattar et al. 2002; Moore 1973). Další vstupní dráhou je genikulohypotalamický trakt zajišťující nepřímou světelnou synchronizaci (Shibata and Moore 1993).

Každé jádro SCN lze rozdělit na dvě oblasti – ventrolaterální („core“ – jádro) a dorzomediální oblast („shell“ – plášť) (Leak and Moore 2001). Informace z retinohypotalamického traktu je vedena do dorzomediální oblasti SCN, odkud je přenášena do ventrolaterální oblasti a následně do celého mozku (Moore 1973; Leak and Moore 2001).

2.3 Molekulární mechanismus hodin

Molekulární hodiny fungují na bázi zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček, které řídí rytmické, dvacet čtyř hodinové vzorce hodin (Dunlap 1999). Jsou tvořeny hodinovými geny a jejich proteinovými produkty. Generují cirkadiánní rytmy v jednotlivých buňkách organismu (Takahashi 2004).

2.3.1 Zpětnovazebné smyčky

Hlavní hodinové geny izolované na přelomu 20. a 21. století jsou *Clock* (King et al. 1997) a *Bmal1* (Bunger et al. 2000). Proteiny CLOCK a BMAL1 v jádře tvoří heterodimer, aktivují transkripci genů *Per1,2* (*Period*) (Konopka and Benzer 1971) a *Cry1,2* (*Cryptochrome*) (Kume et al. 1999) vazbou na tzv. E-box elementy v jejich promotoru. Proteiny PER a CRY tvoří v cytoplazmě represorový komplex a následně se translokují zpět do jádra. Zde se váží na komplex CLOCK/BMAL1 a tlumí tak jejich aktivační potenciál. To vede k poklesu exprese *Per* a *Cry*, k následnému snížení hladiny jejich proteinů a potlačení jejich inhibičního působení na vlastní transkripci. Tento proces se děje v noci, následující ráno CLOCK/BMAL1 obnoví nové

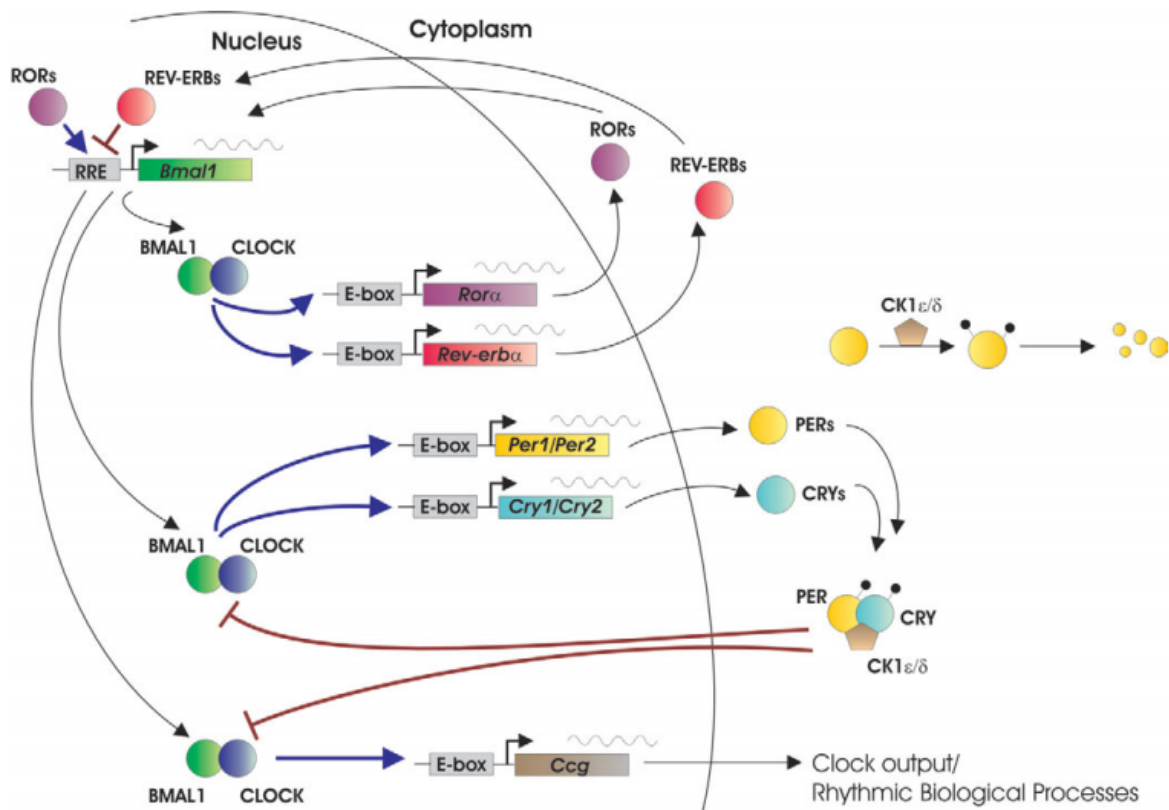
kolo transkripce genů *Per* a *Cry* (King and Takahashi 2000; Ko and Takahashi 2006) a děj se opakuje. V důsledku tohoto zpětnovazebného mechanismu vykazuje exprese hodinových genů cirkadiánní rytmus.

Na regulaci exprese genu *Bmal1* se podílí sekundární smyčka tvořená jadernými receptory REV-ERB α a ROR α (Sato et al. 2004; Preitner et al. 2002). Heterodimer CLOCK/BMAL1 spouští jejich transkripci a jaderné receptory zpětnovazebně regulují expresi *Bmal1* vazbou na promotorovou oblast. REV-ERB α působí jako inhibitor a ROR α jako aktivátor (viz obr. 1; Ko and Takahashi 2006).

Dalšími regulačními faktory jsou kasein kináza 1 ϵ (CK1 ϵ) a kasein kináza 1 delta (CK1 δ). Fosforylují PER proteiny a podporují jejich degradaci zprostředkovanou ubiquitin-proteazomovou dráhou (Akashi et al. 2002).

2.3.1.1 Hodinami kontrolované geny

Hodinové geny (tzv. clock genes) generující zpětnovazebné smyčky řídí také expresi hodinově řízených genů (CCG – clock-controlled genes), které následně regulují navazující fyziologické procesy v periferních tkáních, jako např. v játrech, v srdci, ve střevním epitelu nebo v mozku (Rosenwasser and Turek 2015; Storch et al. 2002; Murakami et al. 2008; Rath et al. 2012). CCG jsou řízeny různým způsobem, vazbou na E-box pomocí CLOCK-BMAL1 heterodimeru, přes ROR-elementy (pomocí ROR a REV-ERB) a přes D-box. Podle způsobu regulace se liší, v jakou denní dobu jsou CCG exprimovány (Korenčič et al. 2014).



Obr. 1.: Schéma zpětnovazebných smyček. Schéma zpětnovazebných smyček molekulárních hodin. V primární smyčce heterodimer CLOCK/BMAL1 aktivuje transkripci *Per* a *Cry* během dne. Interakce PER a CRY a jejich následná translokace do jádra potlačuje aktivační působení CLOCK/BMAL1 během noci. Podobným mechanismem jsou regulovány také CCG. V sekundární smyčce jaderné receptory RORα a REV-ERBa aktivují či inhibují expresi *Bmal1* (Ko and Takahashi 2006).

2.4 Periferní oscilátory

K expresi hodinových genů dochází nejen v centrálních hodinách, ale i v jiných částech mozku a v periferních orgánech, jako jsou např. játra, plíce, ledviny, kosterní svalstvo apod (Yamazaki et al. 2000; Yoo et al. 2004). Periferní oscilátory jsou z dlouhodobého hlediska závislé na centrálních hodinách v SCN, které zajišťují fázovou soudržnost uvnitř a mezi tkáněmi (Stratmann and Schibler 2006). SCN synchronizuje periferní oscilátory pomocí neurálních a humorálních výstupů. Svými projekcemi do dalších hypotalamických jader ovlivňuje aktivitu autonomního nervového systému a řídí rytmickou syntézu glukokortikoidů, schopných nastavit fázi periferních hodin (Balsalobre 2000; Reppert and Weaver 2002). Jednotlivé

periferní tkáně obsahují cirkadiánní oscilátory schopné trvalé rytmicity v *ex vivo* podmínkách po dobu až 20 dnů nezávisle na účasti SCN (Yoo et al. 2004).

Periferní oscilátory jsou synchronizovány také pomocí signálů, které nejsou přímo závislé na SCN, např. teplotou či příjmem potravy. Kolísání teploty může fázově posunout periferní cirkadiánní rytmy *in vivo* a omezení dostupnosti potravy po delší dobu vede k desynchronizaci periferních hodin a centrálního pacemakeru (Damiola 2000; Brown et al. 2002).

2.5 Melatonin

Melatonin je endokrinní hormon syntetizovaný epifýzou. Jeho syntéza je u savců časována hlavními hodinami SCN a synchronizuje se s cyklem světla a tmy pomocí fotosenzitivních gangliových buněk (Cipolla-Neto and Do Amaral 2018). K nejvyšší syntéze melatoninu dochází za tmy, ale noční vystavení světlu jeho syntézu potlačí (Lewy et al. 1980). Melatonin má přímé účinky na regulační mechanismy spánku (Dijk and Cajochen 1997). Večerním zvýšením hladiny melatoninu začíná tzv. termoregulační kaskáda, sníží se produkce tepla a dochází k nástupu spánku (Kräuchi et al. 2000).

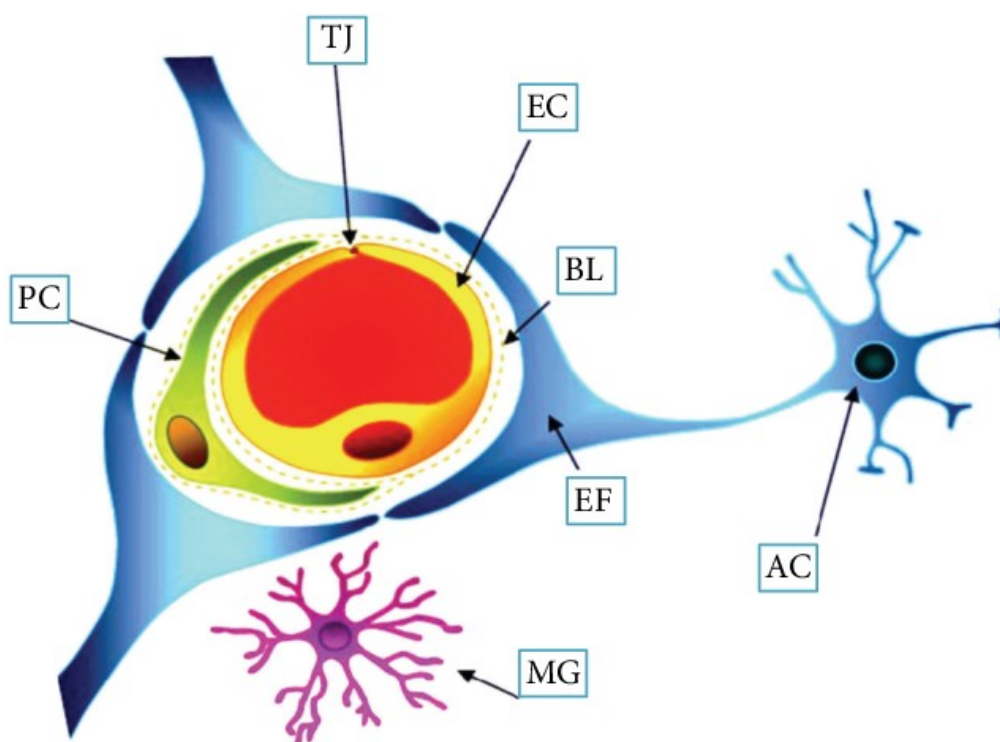
3. Hematoencefalická bariéra

V 19. století německý lékař Paul Ehrlich při svém experimentu zjistit, že injekční podání barviva do cévního systému vedlo k obarvení všech orgánů s výjimkou mozku a mozkomíšního moku. Tento jev následně pozoroval i neurolog Max Lewandowski, který došel k závěru, že kapilární stěny v mozku tvoří bariéru pro určité molekuly a stanovil pojem hematoencefalická bariéra (HEB) (Dyrna et al. 2013; Risau and Wolburg 1990).

HEB je mnohobuněčná, dynamická struktura, která přísně reguluje transport mezi krví a CNS pro vodu, ionty, glukózu, aminokyseliny, hormony apod. HEB touto řízenou výměnou jednotlivých látek udržuje homeostázu CNS, což umožňuje správnou neuronální funkci a ochranu CNS před toxiny a patogeny (Dyrna et al. 2013; Smith 2000).

3.1 Struktura hematoencefalické bariéry

Hematoencefalická bariéra je komplexní systém skládající se ze specializovaných endoteliálních buněk, bazální membrány, pericytů, astrocytů a imunitních buněk (**viz obr. 2**). Tento komplex poskytující strukturální a funkční podporu HEB, regulující transport látek do CNS se nazývá neurovaskulární jednotka. Dysfunkce jakékoli ze složek neurovaskulární jednotky může více či méně ovlivnit propustnost HEB (Obermeier et al. 2013). Důležitou součástí HEB jsou těsné spoje (TJs – z ang. tight junctions) mezi endoteliálními buňkami, které se podílí na regulaci propustnosti bariéry (Daneman and Prat 2015).



Obr. 2.: Neurovaskulární jednotku HEB tvoří endoteliální buňky (EC), které jsou spojeny těsnými spoji (TJ). Pericyty (PC), které neúplně lemuji endotel a jsou uzavřené v bazální lamině (BL). Dále astrocyty (AC), jejichž výběžky (EF) tvoří nejsvrchnější vrstvu a mikroglie zajišťující imunitní funkci (Islam and Mohamed 2015).

3.1.1 Endoteliální buňky

Endoteliální buňky hematoencefalické bariéry tvoří souvislou plochu pokrývající lumen mozkových cév a jsou navzájem propojeny pomocí TJ, které omezují tok rozpuštěných látek mezi buňkami (Brightman and Reese 1969). Endoteliální buňky centrální nervové soustavy na rozdíl od periferních endoteliálních buněk mají sníženou schopnost transcytózy. Díky těmto regulovaným vlastnostem buněčného transportu je docíleno přísné kontroly pohybu látek mezi krví a mozkem (Coomber and Stewart 1985).

3.1.1.1 Transport mezi endoteliálními buňkami

V membránách endoteliálních buněk se nacházejí kromě TJ další mezibuněčná spojení: gap junctions a adherence junctions (Simard et al. 2003). Gap junctions zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, naopak adherence junctions spolu s TJs regulují paracelulární transport (Bazzoni and Dejana 2004).

TJs zprostředkovávají adhezi mezi jednotlivými endoteliálními buňkami, tvoří se na laterální části plazmatické membrány interakcemi transmembránových molekul, které jsou spojeny s cytoskeletem. Mezi komponenty TJ patří kladiny, okludiny a adhezní molekuly JAMs (junctional adhesion molecules) (Wolburg and Lippoldt 2002), na cytoplazmatické konce těchto molekul se váží proteiny typu zonula occludens (ZO-1, 2, 3) a tím dochází ke spojení s aktinovou složkou cytoskeletu. Toto uspořádání tvoří komplexní a stabilní síť TJ (Mitic et al. 2000).

3.1.2 Pericyty

Endoteliální buňky obklopuje bazální lamina s pericyty, které neúplně lemují cévu. Pericyty obsahují kontraktilní proteiny, které umožňují zužování cév a regulaci průtoku skrz kapiláry (Peppiatt et al. 2006). Pericyty inhibují expresi molekul zvyšující vaskulární permeabilitu a regulují tvorbu TJs. Zároveň jsou nezbytné pro tvorbu HEB, nedostatek pericytů může vést k dysfunkci HEB a jejímu rozpadu (Daneman et al. 2010). Stejně jako většina buněk těla, obsahují pericyty cirkadiánní hodiny. Bylo zjištěno, že hodinový gen *Bmal1* udržuje integritu HEB prostřednictvím regulace pericytů (Nakazato et al. 2017).

V pokusech s myšími modely s delecí *Bmal1* docházelo k výraznému snížení počtu buněk s PDGFR β (z ang. Platelet derived growth factor receptor β) v mozkové kůře. PDGFR β

je marker pericytů a protein nezbytný pro udržení integrity HEB. Transkripce *pdgfrβ* je pozitivně regulována *Bmal1*, což naznačuje, že snížená exprese *Bmal1* je zodpovědná za downregulaci exprese PDGFRβ. To následně vede k dysfunkci pericytů a zvýšené propustnosti HEB (Nakazato et al. 2017).

3.1.3 Astrocyty

Nejsvrchnější vrstvou buněk jsou astrocyty, poskytující pomocí svých buněčných výběžků spojení mezi neurony a mozkovými cévami (Abbott et al. 2006). Astrocyty se podílí na výživě neuronů a regulují kontrakci a dilataci hladké svaloviny cév. Spojení s neurony i cévami umožňuje astrocytům přenášet signály, které regulují průtok krve v reakci na neuronální aktivitu (Gordon et al. 2011).

Cirkadiánní rytmicita byla pozorována na modelu myši také v astrocytech. Spřažení exprese hodinového genu *Per2* s expresí enzymu luciferázy umožnilo prokázat jeho rytmickou expresi a existenci hodinového mechanismu v astrocytech (Prolo 2005).

Hodinový protein BMAL1 hraje rozhodující roli v aktivaci astrocytů. Delece *Bmal1* vede k astroglióze a zhoršení podpůrné funkce astrocytů, což způsobuje poškození okolních neuronů (Lananna et al. 2018).

3.2 Transportéry hematoencefalické bariéry

Molekuly mohou přes HEB přecházet prostou difúzí, receptorem zprostředkovanou transcytózou nebo aktivními či usnadněnými transportními mechanismy, jako jsou iontové kanály, specifické transportéry nebo energeticky závislé pumpy (Fu 2018).

Malé hydrofobní molekuly (např. O₂, CO₂) mohou volně vstupovat do mozku difúzí po koncentračním spádu. Glukóza či aminokyseliny se přes HEB dostávají prostřednictvím usnadněného transportu zprostředkovaného specifickými proteiny, např. k transportu glukózy slouží glukózový přenašeč GLUT-1 (Cornford, Hyman, and Swartz 1994). Větší molekuly, jako inzulin nebo transferin jsou přenášeny pomocí receptorem zprostředkované transcytózy (Fu 2018).

V endoteliálních buňkách se hojně vyskytují P-glykoproteinové transportéry (Pgp), patřící do rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů. Pgp fungují jako efluxní pumpy

závislé na ATP a zajišťují vylučování xenobiotik z mozku. (Cordon-Cardo et al. 1989; Löscher and Potschka 2005).

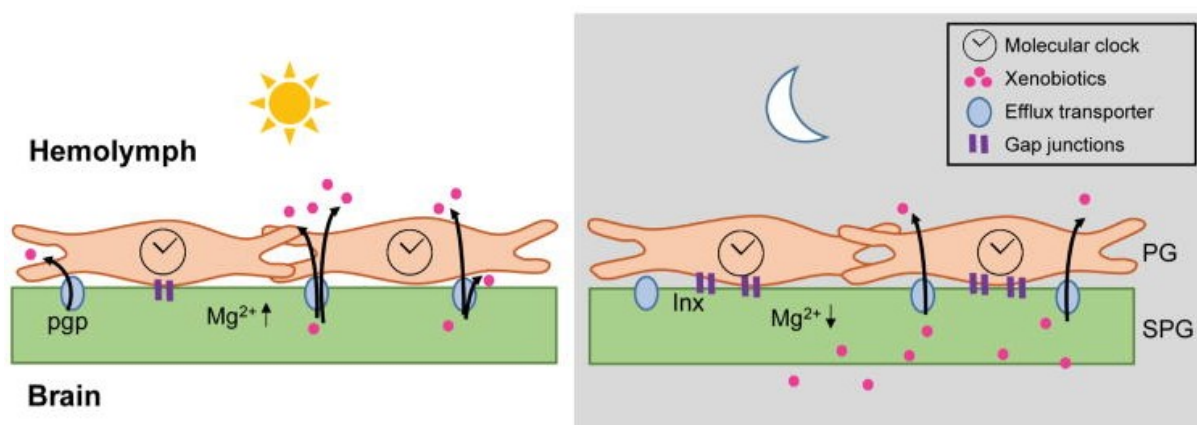
4. Regulace hematoencefalické bariéry cirkadiánními rytmy

Studie Zhang a kol. z roku 2018 popsala na modelu octomilky cirkadiánní regulaci propustnosti HEB. Mozek octomilky je od hemolymfy oddělen bariérou, kterou tvoří dvě vrstvy gliových buněk: perineurální glie (PG) a subperineurální glie (SPG). PG a SPG mezi sebou komunikují pomocí gap junctions (Desalvo et al. 2011; Spéder and Brand 2014). Eflux xenobiotik přes HEB bezobratlých je zprostředkován transportérem Mdr65, který je homologní transportéru Pgp u savců a nachází se v SPG buňkách (Mayer et al. 2009).

Ve studii (Zhang et al. 2018) bylo do oběhu octomilky každé 4 hodiny během 24 hodin injekčně podáváno fluorescenční barvivo Rhodamin B a hodinu po podání bylo měřeno jeho množství v mozku. Hladina Rhodaminu B v mozku vykazovala cirkadiánní oscilace, nejvyšší byla naměřena v noci během klidové fáze.

V PG buňkách byla detekována rytmicita hodinového PER proteinu. Při narušení hodin v PG již nedošlo ke změnám hladiny xenobiotika v mozku, což naznačuje, že hodinový mechanismus v PG je nezbytný pro cirkadiánní rytmy v propustnosti HEB. Studie také popsala způsob, jakým cirkadiánní rytmy řídí eflux látek z mozku a tedy i propustnost HEB během 24 hodin (Zhang et al. 2018).

Molekulární hodiny v PG buňkách regulují expresi proteinů gap junctions (Inx1 a Inx2) a tím ovlivňují výměnu látek mezi oběma vrstvami buněk. To ovlivňuje i průchod Mg^{2+} iontů, které slouží jako pozitivní regulátor aktivity transportérů Mdr65. Během dne, kdy je nižší počet spojů gap junction je vyšší hladina Mg^{2+} iontů v SPG, což vede ke zvýšení aktivity transportérů Mdr65 a snížení propustnosti HEB pro podávaná xenobiotika. V noci je četnost spojů gap junction vyšší, proto dochází k difuzi Mg^{2+} do PG vrstvy buněk a snížení hladiny Mg^{2+} v SPG buňkách, což snižuje eflux látek a zvyšuje propustnost HEB (**viz obr. 3**; Zhang et al. 2018; Booth et al. 2000).



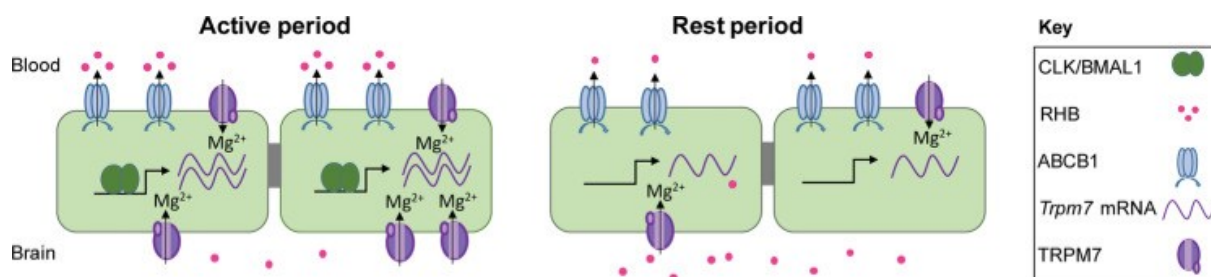
Obr. 3.: Model regulace HEB u octomilky. Horní vrstva perineurálních glií (PG) obsahuje molekulární hodiny. Subperineurální glie (SPG) ve spodní vrstvě řídí eflux látek z mozku. Cirkadiánní oscilace spojů gap junction mezi oběma vrstvami řídí hladinu Mg^{2+} a tím také eflux xenobiotik z mozku. (Zhang et al. 2018).

Podobně jako u octomilky byl zjišťován vliv cirkadiánního systému na regulaci propustnosti HEB u savců. Hladina Rhodaminu B v mozku myši také oscilovala během 24 hodin a vykazovala pravidelný cyklus s vrcholem po svítání a minimem po setmění. To naznačuje, že eflux zprostředkovaný Pgp transportéry je nejvyšší v noci, když jsou zvířata aktivní (Zhang et al. 2021).

Mechanismus cirkadiánní regulace byl objasněn experimentem provedeným na lidské mozkové endoteliální buněčné linii. Tak jako u octomilky byla i zde aktivita transportéru Pgp řízena intracelulární koncentrací Mg^{2+} . Studie ukázala, že transportéry hořčíku (TRPM7), které regulují hladinu intracelulárního Mg^{2+} , jsou přímo ovlivněny molekulárními hodinami (Zhang et al. 2021).

Bylo zjištěno, že BMAL1 se váže na promotor TRPM7 a tím ovlivňuje jeho expresi. Nízká hladina BMAL1 snižuje expresi TRPM7 a následně i koncentraci intracelulárního Mg^{2+} . Tím dochází ke snížení efluxu xenobiotik a většímu zadržování Rhodaminu B v mozku. Vyšší hladina BMAL1 naopak zvyšuje expresi TRPM7, což podporuje eflux xenobiotik (**viz obr. 4**; Zhang et al. 2021).

Tyto poznatky naznačují, že cirkadiánní regulace HEB významně ovlivňuje průchod cizorodých látek, včetně léčiv, do mozkové tkáně. Z toho vyplývá důležitost správného načasování léčby zaměřené na centrální nervový systém.



Obr. 4.: Regulace HEB u myšího modelu. V aktivní části dne BMAL1 aktivuje transkripci *Trpm7*, zvyšuje se intracelulární Mg^{2+} a eflux xenobiotik je vyšší. Nižší hladiny Mg^{2+} v nepřítomnosti BMAL1 vedou k vyššímu zadržování xenobiotik v mozku (Zhang et al. 2021).

4.1 Vliv melatoninu na propustnost hematoencefalické bariéry

Bylo prokázáno, že melatonin, jehož syntéza je řízena z SCN, má ochranné účinky proti zvýšené propustnosti HEB indukované interleukinem-1 β . Interleukin-1 β aktivuje sekreci matrix-metaloproteinázy 9 (MMP-9) z pericytů. Vyšší sekrece MMP-9 inhibuje expresi proteinů okcludinu, kladinu-5 a zonula occludens-1, které tvoří tight junctions (TJs) mezi endoteliálními buňkami. Tím zvyšuje permeabilitu HEB a přispívá k jejímu poškození při neurozánětlivých onemocněních (Cui et al. 2017; Machida et al. 2015; Qin et al. 2019).

Melatonin působí inhibičně na MMP-9, podporuje obnovení exprese proteinů tvořících TJs a integritu HEB (Qin et al. 2019).

5. Spánek

Spánek je jeden z fyziologických výstupů biologických hodin. Během spánkové epizody dochází ke střídání REM (z ang. rapid eye movement – rychlé pohyby očí) a non-REM fáze (Chokroverty 2010). Regulaci spánku a bdění modulují dva protichůdné faktory, cirkadiánní rytmus a homeostatický mechanismus. Cirkadiánní rytmus ovlivňuje načasování a dobu trvání spánku. Homeostatický tlak zvyšuje potřebu spánku a jeho působení je tím vyšší, čím delší je předchozí doba bdělosti. Od probuzení se postupně zvyšuje a přes den je potlačován signály z SCN. Vliv SCN během dne postupně slábne a dochází k nástupu spánku. Ráno je naopak

homeostatický tlak nízký a vlivem podnětů z SCN dochází k probuzení (Chokroverty 2010; Reid 2019).

Informace pro regulaci spánku přichází z SCN. Z dorzomediální oblasti SCN jsou vysílány signály přes ventrální subparaventrikulární zónu do jádra dorzomediálního hypotalamu, odkud vedou eferentní dráhy do ventrolaterální preoptické oblasti, která podporuje spánek (Leak et al. 1999; Chou et al. 2002). Pokud dojde k lézi SCN, desynchronizuje se doba spánku, náhodně dochází ke stavům spánku a bdění a celková délka spánku se prodlouží (Edgar et al. 1993).

5.1 Regulace hematoencefalické bariéry spánkem

Spánek a jeho případné omezení hraje důležitou roli v regulaci propustnosti HEB. Jak chronické omezení spánku, tak i nedostatečné množství REM fáze spánku snižuje eflux xenobiotik z mozku a ovlivňuje permeabilitu HEB. Během spánku dochází k vyššímu odplavování odpadních produktů z intersticiálního prostoru. Deficit spánku přispívá k akumulaci škodlivých látek, jako je amyloid- β , v mozku (He et al. 2014; Gomez-Gonzalez et al. 2013; Xie et al. 2013).

Studie Arthiushin a kol. z roku 2018 také prokázala vzájemný vztah spánku a endocytózy přes HEB, kde utlumení procesu endocytózy vedlo k prodloužení celkové doby spánku.

5.1.1 Spánková deprivace

Nedostatečné množství doby spánku je v dnešní společnosti běžným jevem, může být způsobeno řadou faktorů, jako jsou např. pracovní nároky, sociální a domácí povinnosti nebo životní styl. Chronická spánková deprivace (CSR – chronic sleep restriction) je spojena s kardiovaskulárními chorobami, diabetem, depresí či nadváhou. Spánek je nezbytný homeostatický proces a jeho omezení má negativní vliv na kognitivní a fyziologické funkce (Banks and Dinges 2007; Krueger and Friedman 2009).

CSR ovlivňuje i správnou funkci HEB. Omezení spánku po dobu 6 dnů u myší bylo dostatečné k narušení HEB. CSR snížilo funkci transportéru glukózy downregulací exprese GLUT1 a snížilo expresi některých proteinů tvořících těsné spoje (zejména okcludinu, kladinu-

1 a kladinu-5), což vedlo k narušení integrity endoteliálních buněk bariéry a zvýšilo propustnost HEB (He et al. 2014).

U myší s CSR byly také pozorovány nižší hladiny NO syntáz, to naznačuje sníženou produkci oxidu dusnatého. Oxid dusnatý způsobuje vazodilataci cév a zvýšený průtok krve mozkovými kapilárami, snížením množství oxidu dusnatého tedy dochází ke snížení průtoku krve mozkovými kapilárami. Dále došlo ke zvýšení exprese COX-2, zánětlivého markeru HEB, který je spojen s vazokonstrikcí a endoteliální dysfunkcí. Tyto změny mohou vést společně se sníženou funkcí transportu glukózy k narušení HEB a zvýšení její propustnosti (He et al. 2014).

Po 24 hodinách zotavovacího spánku se funkce transportérů glukózy, exprese TJ proteinů a hladiny NO syntáz a COX-2 vrátily do normálních hodnot a byla obnovena obvyklá míra propustnosti HEB (He et al. 2014).

5.1.1.1 Omezení REM fáze spánku

Studie z roku 2013 objasnila účinky omezení REM fáze spánku na propustnost HEB použitím Evansové modři. Absence REM fáze spánku po dobu 10 dnů vyvolala u potkanů rozsáhlé narušení HEB. Po 40-120 minutách zotavovacího spánku došlo k postupnému obnovení propustnosti HEB ve většině studovaných oblastí mozku (Gomez-Gonzalez et al. 2013).

120 minut zotavujícího spánku obnovilo normální propustnost HEB např. v amygdale, insule a hypotalamu. Oblasti jako hipokampus, motorická a somatosenzorická kůra vykazovaly po zotavovacím spánku částečné obnovení propustnosti, nicméně hladiny Evansové modři byly stále významně vyšší než u kontrolní skupiny potkanů. U oblastí středního mozku a mozečku byla i po zotavovacím spánku propustnost HEB stále stejně zvýšená (Gomez-Gonzalez et al. 2013).

5.2.1 Vztah spánku a vezikulárního transportu přes hematoencefalickou bariéru

Nedávné studie ukazují vzájemný vztah spánku a vezikulárního transportu napříč gliovými buňkami u octomilky obecné. Bylo zjištěno, že k transportu vezikulů přes mozkovou bariéru octomilky dochází přednostně během spánku. Nejvyšší transport byl pozorován v časných nočních hodinách, kdy je potřeba spánku nejvyšší. K nejnižšímu vezikulárnímu

transportu docházelo naopak brzy ráno, kdy je potřeba spánku nízká. Spánek má tedy významný vliv na transport látek skrze gliové buňky mozkové bariéry (Artiushin et al. 2018).

Nejen, že stav spánku a bdění ovlivňuje vezikulární transport přes bariéru, ale také míra transportu v PG a SPG reguluje dobu spánku. Zablokování vezikulárního transportu v PG i SPG způsobilo prodloužení doby spánku. Spánek podporuje také konstitutivně zvýšená aktivita proteinu Rab11 v PG či SPG, který se podílí na transportu vezikulů. (Artiushin et al. 2018).

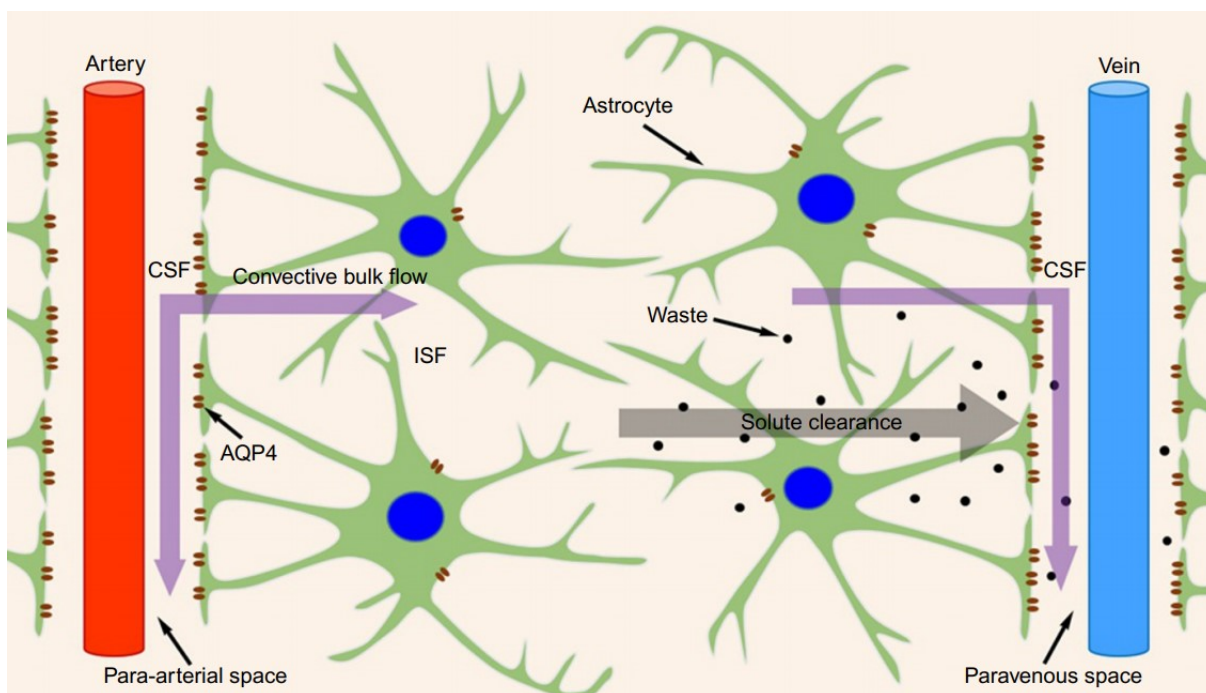
6. Role spánku při onemocněních centrální nervové soustavy

6.1 Clearance pomocí glymfatického systému

Metabolity a odpadní produkty, včetně amyloidu- β ($A\beta$), jsou z mozku odstraňovány pomocí mozkomíšního moku a intersticiální tekutiny. Astrocytární vodní kanály aquaporiny-4 (AQP4) zprostředkovávají transport mozkomíšního moku z paraarteriálního prostoru do intersticia, kde se mísí s intersticiální tekutinou a pohání odplavení (tzv. clearance) odpadních produktů z mozkového parenchymu. Díky významné roli glií a podobnosti s lymfatickým systémem se tato dráha nazývá glymfatický systém (**viz obr. 5**; Iliff et al. 2012).

Ve studii Xie a kol. z roku 2013 bylo zjištěno, že objem intersticiálního prostoru se liší u bdělých a spících myší. U bdělých myší byla potlačena clearance v důsledku zmenšení intersticiálního prostoru, což snížilo tok intersticiální tekutiny a mozkomíšního moku.

Naopak během spánku došlo ke zvětšení intersticiálního prostoru o více než 60%, což naznačuje, že spánek usnadňuje vyplavování odpadních produktů, jako např. amyloidu- β , z mezibuněčného prostoru mozku. (Xie et al. 2013).



Obr. 5.: Schéma glymfatické dráhy. Mozkomíšní mok (CSF) vstupuje do mozku paraarteriálními cestami a mění se s intersticiální tekutinou (ISF), která je z mozku odstraňována paravenózními cestami. Astroglální vodní kanály (AQP4) zprostředkovávají tok intersticiální tekutiny a řídí odstraňování odpadních látek z mozkového parenchymu (Gu et al. 2019).

6.2 Hromadění amyloidu- β a proteinu Tau

Akumulace peptidu amyloidu- β v extracelulárním prostoru mozku je charakteristickým znakem Alzheimerovy choroby. Tento proces je závislý na clearance $A\beta$ z mozku, kterou zprostředkovává glymfatický systém a HEB. Dysfunkce HEB snižuje eflux $A\beta$ do periferního oběhu, což vede k jeho akumulaci v mozku (Qosa et al. 2014; Iliff et al. 2012).

Experiment na myších prokázal vliv spánku na hladiny $A\beta$. Spánková deprivace zvýšila hladiny $A\beta$ v intersticiální tekutině a urychlila akumulaci amyloidního plaku. Po následném zotavovacím spánku došlo k okamžitému snížení $A\beta$ v intersticiální tekutině. Také zablokování receptoru pro orexin (neuropeptid podporující bdělost) na 24 hod zvýšilo dobu spánku přibližně o 10%, což vedlo k výraznému snížení tvorby plaků $A\beta$. (Kang et al. 2009; Lin et al. 1999).

Podobně, jako hromadění A β v mozku při spánkové deprivaci u myší, byly testovány i hladiny A β v mozkomíšním moku u lidí. Spánková deprivace vedla u lidí k 25-30% nárůstu A β v mozkomíšním moku (Lucey et al. 2018).

Agregace A β pravděpodobně zahajuje patogenezi Alzheimerovy choroby. Zdá se však, že k neurodegeneraci vede akumulace cytoplazmatického proteinu Tau, který se nachází v neuronech (Binder et al. 1985; Holth et al. 2019). Hromadění Tau v mozku může vést ke ztrátě a dysfunkci neuronů, což následně způsobuje kognitivní poruchy (Bejanin et al. 2017).

Hladiny Tau v intersticiální tekutině a mozkomíšním moku jsou podobně jako u A β regulovány cyklem spánku a bdění. Intersticiální množství proteinu Tau u myší i Tau v mozkomíšním moku u lidí je zvýšeno při spánkové deprivaci (Holth et al. 2019).

Tyto výsledky naznačují, že patologické procesy spojené s Alzheimerovou chorobou, jako je akumulace A β a Tau v mozku, úzce souvisí s cyklem spánku a bdění a dysfunkcí HEB.

7. Závěr

Cílem práce bylo shrnout poznatky o regulaci hematoencefalické bariéry spánkem a cirkadiánním systémem.

Bariéra mezi mozkovou tkání a krví je důležitá pro udržení správné nervové funkce a homeostázy v prostředí CNS. Jeden z faktorů působících negativně na HEB je spánková deprivace, která je častou součástí moderního způsobu života. Chronická spánková deprivace přispívá k poškození HEB, což napomáhá rozvoji řady onemocnění CNS. Cirkadiánní systém reguluje propustnost HEB v průběhu 24 hodin a ovlivňuje průchod cizích látek, i léčiv, do mozkové tkáně. Znalost cirkadiánní regulace HEB může pomoci správně načasovat podávání léků, které jsou zaměřené na CNS.

8. Použitá literatura

- *Abbott, N. Joan, Lars Rönnebeck, and Elisabeth Hansson. 2006. "Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier." *Nature Reviews Neuroscience*.
- Akashi, Makoto, Yoshiki Tsuchiya, Takao Yoshino, and Eisuke Nishida. 2002. "Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in Cultured Cells." *Molecular and Cellular Biology* 22 (6).
- Artiushin, Gregory, Shirley L Zhang, Hervé Tricoire, and Amita Sehgal. 2018. "Endocytosis at the Drosophila Blood–Brain Barrier as a Function for Sleep." *ELife* 7 (November).
- Balsalobre, A. 2000. "Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling." *Science* 289 (5488).
- *Banks, Siobhan, and David F. Dinges. 2007. "Behavioral and Physiological Consequences of Sleep Restriction." *Journal of Clinical Sleep Medicine*.
- *Bazzoni, Gianfranco, and Elisabetta Dejana. 2004. "Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis." *Physiological Reviews*.
- Bejanin, Alexandre, Daniel R. Schonhaut, Renaud La Joie, Joel H. Kramer, Suzanne L. Baker, Natasha Sosa, Nagehan Ayakta, et al. 2017. "Tau Pathology and Neurodegeneration Contribute to Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease." *Brain* 140 (12).
- Binder, L I, A Frankfurter, and L I Rebhun. 1985. "The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System." *The Journal of Cell Biology* 101 (4).
- Booth, Catherine L., Lukasz Pulaski, Michael M. Gottesman, and Ira Pastan. 2000. "Analysis of the Properties of the N-Terminal Nucleotide-Binding Domain of Human P-Glycoprotein." *Biochemistry* 39 (18).
- Brightman, M. W., and T. S. Reese. 1969. "Junctions between Intimately Apposed Cell Membranes in the Vertebrate Brain." *The Journal of Cell Biology* 40 (3).
- Brown, Steven A, Gottlieb Zumbrunn, Fabienne Fleury-Olela, Nicolas Preitner, and Ueli Schibler. 2002. "Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks." *Current Biology* 12 (18).
- Bunger, Maureen K., Lisa D. Wilsbacher, Susan M. Moran, Cynthia Clendenin, Laurel A. Radcliffe, John B. Hogenesch, M. Celeste Simon, Joseph S. Takahashi, and Christopher A. Bradfield. 2000. "Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals." *Cell* 103 (7).

- *Cavallera, G. M., and S. Giudici. 2008. "Morningness and Eveningness Personality: A Survey in Literature from 1995 up till 2006." *Personality and Individual Differences*.
- *Chokroverty, S. 2010. "Overview of Sleep & Sleep Disorders." *Indian Journal of Medical Research*.
- Chou, Thomas C., Alvild A. Bjorkum, Stephanie E. Gaus, Jun Lu, Thomas E. Scammell, and Clifford B. Saper. 2002. "Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus." *Journal of Neuroscience* 22 (3).
- *Cipolla-Neto, José, and Fernanda Gaspar Do Amaral. 2018. "Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights." *Endocrine Reviews*.
- Coomber, B. L., and P. A. Stewart. 1985. "Morphometric Analysis of CNS Microvascular Endothelium." *Microvascular Research* 30 (1).
- Cordon-Cardo, C., J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J. L. Biedler, M. R. Melamed, and J. R. Bertino. 1989. "Multidrug-Resistance Gene (P-Glycoprotein) Is Expressed by Endothelial Cells at Blood-Brain Barrier Sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (2).
- Cornford, E. M., S. Hyman, and B. E. Swartz. 1994. "The Human Brain GLUT1 Glucose Transporter: Ultrastructural Localization to the Blood-Brain Barrier Endothelia." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14 (1).
- *Cui, Ning, Min Hu, and Raouf A. Khalil. 2017. "Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases." In .
- Damiola, F. 2000. "Restricted Feeding Uncouples Circadian Oscillators in Peripheral Tissues from the Central Pacemaker in the Suprachiasmatic Nucleus." *Genes & Development* 14 (23).
- *Daneman, Richard, and Alexandre Prat. 2015. "The Blood–Brain Barrier." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (1).
- Daneman, Richard, Lu Zhou, Amanuel A. Kebede, and Ben A. Barres. 2010. "Pericytes Are Required for Blood–Brain Barrier Integrity during Embryogenesis." *Nature* 468 (7323).
- *Desalvo, Michael K., Nasima Mayer, Fahima Mayer, and Roland J. Bainton. 2011. "Physiologic and Anatomic Characterization of the Brain Surface Glia Barrier of *Drosophila*." *GLIA* 59 (9).
- *Dijk, Derk Jan, and Christian Cajochen. 1997. "Melatonin and the Circadian Regulation of Sleep Initiation, Consolidation, Structure, and the Sleep EEG." *Journal of Biological*

Rhythms 12 (6).

*Dunlap, Jay C. 1999. "Molecular Bases for Circadian Clocks." *Cell*.

*Dyrna, Felix, Sophie Hanske, Martin Krueger, and Ingo Bechmann. 2013. "The Blood-Brain Barrier." *Journal of Neuroimmune Pharmacology*.

Edgar, D. M., W. C. Dement, and C. A. Fuller. 1993. "Effect of SCN Lesions on Sleep in Squirrel Monkeys: Evidence for Opponent Processes in Sleep-Wake Regulation." *Journal of Neuroscience* 13 (3).

*Fu, Bingmei M. 2018. "Transport across the Blood-Brain Barrier." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 1097.

*Fuhr, Luise, Mónica Abreu, Patrick Pett, and Angela Relógio. 2015. "Circadian Systems Biology: When Time Matters." *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015.

Gomez-Gonzalez, Beatriz, Gabriela Hurtado-Alvarado, Enrique Esqueda-Leon, Rafael Santana- Miranda, Jose Rojas-Zamorano, and Javier Velazquez-Moctezuma. 2013. "REM Sleep Loss and Recovery Regulates Blood-Brain Barrier Function." *Current Neurovascular Research* 10 (3).

Gordon, Grant R.J., Clare Howarth, and Brian A. Macvicar. 2011. "Bidirectional Control of Arteriole Diameter by Astrocytes." In *Experimental Physiology*. Vol. 96.

Gu, Xiao, Xiuxiu Hao, Xiaoyu Shen, Hualin Wang, Yuyan Zhang, and Xiaoling Gao. 2019. "The Elimination of Brain-Targeted Nanomaterials." In *Brain Targeted Drug Delivery System*. Elsevier.

Hattar, S., H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson, and K. W. Yau. 2002. "Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity." *Science* 295 (5557).

He, Junyun, Hung Hsuehou, Y. He, Abba J. Kastin, Yuping Wang, and Weihong Pan. 2014. "Sleep Restriction Impairs Blood-Brain Barrier Function." *Journal of Neuroscience* 34 (44).

Holth, Jerrah K., Sarah K. Fritsch, Chanung Wang, Nigel P. Pedersen, John R. Cirrito, Thomas E. Mahan, Mary Beth Finn, et al. 2019. "The Sleep-Wake Cycle Regulates Brain Interstitial Fluid Tau in Mice and CSF Tau in Humans." *Science* 363 (6429).

Illiff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, et al. 2012. "A Paravascular Pathway Facilitates CSF

Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β ." *Science Translational Medicine* 4 (147).

*Islam, Md. Mirazul, and Zahurin Mohamed. 2015. "Computational and Pharmacological Target of Neurovascular Unit for Drug Design and Delivery." *BioMed Research International* 2015.

Kang, J.-E., M. M. Lim, R. J. Bateman, J. J. Lee, L. P. Smyth, J. R. Cirrito, N. Fujiki, S. Nishino, and D. M. Holtzman. 2009. "Amyloid- β Dynamics Are Regulated by Orexin and the Sleep-Wake Cycle." *Science* 326 (5955).

*King, David P., and Joseph S. Takahashi. 2000. "Molecular Genetics of Circadian Rhythms in Mammals." *Annual Review of Neuroscience*.

King, David P., Yaliang Zhao, Ashvin M. Sangoram, Lisa D. Wilsbacher, Minoru Tanaka, Marina P. Antoch, Thomas D.L. Steeves, et al. 1997. "Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene." *Cell* 89 (4).

*Ko, Caroline H., and Joseph S. Takahashi. 2006. "Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock." *Human Molecular Genetics*.

Konopka, R. J., and S. Benzer. 1971. "Clock Mutants of *Drosophila Melanogaster*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (9).

Korenčič, Anja, Rok Košir, Grigory Bordyugov, Robert Lehmann, Damjana Rozman, and Hanspeter Herzog. 2014. "Timing of Circadian Genes in Mammalian Tissues." *Scientific Reports* 4.

Kräuchi, Kurt, Christian Cajochen, Esther Werth, and Anna Wirz-Justice. 2000. "Functional Link between Distal Vasodilation and Sleep-Onset Latency?" *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278 (3).

Kripke, Daniel F, Katharine M Rex, Sonia Ancoli-Israel, Caroline M Nievergelt, Walt Klimecki, and John R Kelsoe. 2008. "Delayed Sleep Phase Cases and Controls." *Journal of Circadian Rhythms* 6 (0).

Krueger, P. M., and E. M. Friedman. 2009. "Sleep Duration in the United States: A Cross-Sectional Population-Based Study." *American Journal of Epidemiology* 169 (9).

Kume, Kazuhiko, Mark J. Zylka, Sathyanarayanan Sriram, Lauren P. Shearman, David R. Weaver, Xiaowei Jin, Elizabeth S. Maywood, Michael H. Hastings, and Steven M. Reppert. 1999. "MCRY1 and MCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop." *Cell* 98 (2).

- Lananna, Brian V., Collin J. Nadarajah, Mariko Izumo, Michelle R. Cedeño, David D. Xiong, Julie Dimitry, Chak Foon Tso, et al. 2018. "Cell-Autonomous Regulation of Astrocyte Activation by the Circadian Clock Protein BMAL1." *Cell Reports* 25 (1).
- Leak, Rehana K., J. Patrick Card, and Robert Y. Moore. 1999. "Suprachiasmatic Pacemaker Organization Analyzed by Viral Transynaptic Transport." *Brain Research* 819 (1–2).
- Leak, Rehana K., and Robert Y. Moore. 2001. "Topographic Organization of Suprachiasmatic Nucleus Projection Neurons." *Journal of Comparative Neurology* 433 (3).
- Lewy, A., T. Wehr, F. Goodwin, D. Newsome, and S. Markey. 1980. "Light Suppresses Melatonin Secretion in Humans." *Science* 210 (4475).
- Lin, Ling, Juliette Faraco, Robin Li, Hiroshi Kadotani, William Rogers, Xiaoyan Lin, Xiaohong Qiu, Pieter J. De Jong, Seiji Nishino, and Emmanuel Mignot. 1999. "The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the Hypocretin (Orexin) Receptor 2 Gene." *Cell* 98 (3).
- *Löscher, Wolfgang, and Heidrun Potschka. 2005. "Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family." *NeuroRx* 2 (1).
- Lucey, Brendan P., Terry J. Hicks, Jennifer S. McLeland, Cristina D. Toedebusch, Jill Boyd, Donald L. Elbert, Bruce W. Patterson, et al. 2018. "Effect of Sleep on Overnight Cerebrospinal Fluid Amyloid β Kinetics." *Annals of Neurology* 83 (1).
- Machida, Takashi, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Hisayo Takenoshita, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Shinya Dohgu, and Yasufumi Kataoka. 2015. "Brain Pericytes Are the Most Thrombin-Sensitive Matrix Metalloproteinase-9-Releasing Cell Type Constituting the Blood–Brain Barrier in Vitro." *Neuroscience Letters* 599 (July).
- Mayer, Fahima, Nasima Mayer, Leslie Chinn, Robert L. Pinsonneault, Deanna Kroetz, and Roland J. Bainton. 2009. "Evolutionary Conservation of Vertebrate Blood-Brain Barrier Chemoprotective Mechanisms in *Drosophila*." *Journal of Neuroscience* 29 (11).
- *Mitic, Laura L., Christina M. Van Itallie, and James M. Anderson. 2000. "Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight Junction Structure and Function: Lessons from Mutant Animals and Proteins." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- Moore, Robert Y. 1973. "Retinohypothalamic Projection in Mammals: A Comparative Study." *Brain Research* 49 (2).
- Murakami, Yuichi, Yuko Higashi, Naoya Matsunaga, Satoru Koyanagi, and Shigehiro Ohdo.

2008. "Circadian Clock-Controlled Intestinal Expression of the Multidrug-Resistance Gene Mdr1a in Mice." *Gastroenterology* 135 (5).
- Nakazato, Ryota, Kenji Kawabe, Daisuke Yamada, Shinsuke Ikeno, Michihiro Mieda, Shigeki Shimba, Eiichi Hinoi, Yukio Yoneda, and Takeshi Takarada. 2017. "Disruption of Bmal1 Impairs Blood-Brain Barrier Integrity via Pericyte Dysfunction." *Journal of Neuroscience* 37 (42).
- *Obermeier, Birgit, Richard Daneman, and Richard M. Ransohoff. 2013. "Development, Maintenance and Disruption of the Blood-Brain Barrier." *Nature Medicine*.
- Peppiatt, Claire M., Clare Howarth, Peter Mobbs, and David Attwell. 2006. "Bidirectional Control of CNS Capillary Diameter by Pericytes." *Nature* 443 (7112).
- Preitner, Nicolas, Francesca Damiola, Jozsef Zakany, Denis Duboule, Urs Albrecht, and Ueli Schibler. 2002. "The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator University of Geneva University of Geneva." *Cell* 110 (2).
- Prolo, L. M. 2005. "Circadian Rhythm Generation and Entrainment in Astrocytes." *Journal of Neuroscience* 25 (2).
- Qin, Weiwei, Jing Li, Rongjia Zhu, Suhua Gao, Junfen Fan, Mingrong Xia, Robert Chunhua Zhao, and Jiewen Zhang. 2019. "Melatonin Protects Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF-KB Pathway." *Aging* 11 (23).
- Qosa, Hisham, Bilal S. Abuasal, Ignacio A. Romero, Babette Weksler, Pierre Oliver Couraud, Jeffrey N. Keller, and Amal Kaddoumi. 2014. "Differences in Amyloid- β Clearance across Mouse and Human Blood-Brain Barrier Models: Kinetic Analysis and Mechanistic Modeling." *Neuropharmacology* 79.
- Ralph, Martin R., Russell G. Foster, Fred C. Davis, and Michael Menaker. 1990. "Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period." *Science* 247 (4945).
- Rath, Martin F., Kristian Rohde, and Morten Møller. 2012. "Circadian Oscillations of Molecular Clock Components in the Cerebellar Cortex of the Rat." *Chronobiology International* 29 (10).
- *Reid, Kathryn J. 2019. "Assessment of Circadian Rhythms." *Neurologic Clinics*.
- *Reppert, Steven M., and David R. Weaver. 2002. "Coordination of Circadian Timing in Mammals." *Nature* 418 (6901).

- Risau, Werner, and Hartwig Wolburg. 1990. "Development of the Blood-Brain Barrier." *Trends in Neurosciences* 13 (5).
- Rosenwasser, Alan M., and Fred W. Turek. 2015. "Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation." *Sleep Medicine Clinics*.
- Sato, Trey K., Satchidananda Panda, Loren J. Miraglia, Teresa M. Reyes, Radu D. Rudic, Peter McNamara, Kinnery A. Naik, Garret A. Fitzgerald, Steve A. Kay, and John B. Hogenesch. 2004. "A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock." *Neuron* 43 (4).
- Shibata, Shigenobu, and Robert Y. Moore. 1993. "Neuropeptide Y and Optic Chiasm Stimulation of Affect Suprachiasmatic Nucleus Circadian Function in Vitro." *Brain Research* 615 (1).
- Simard, Marie, Gregory Arcuino, Takahiro Takano, Qing Song Liu, and Maiken Nedergaard. 2003. "Signaling at the Gliovascular Interface." *Journal of Neuroscience* 23 (27).
- *Smith, Quentin R. 2000. "Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier." In *Journal of Nutrition*. Vol. 130.
- Spéder, Pauline, and Andrea H. Brand. 2014. "Gap Junction Proteins in the Blood-Brain Barrier Control Nutrient-Dependent Reactivation of Drosophila Neural Stem Cells." *Developmental Cell* 30 (3).
- Stephan, F. K., and I. Zucker. 1972. "Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (6).
- Storch, Kai-Florian, Ovidiu Lipan, Igor Leykin, N. Viswanathan, Fred C. Davis, Wing H. Wong, and Charles J. Weitz. 2002. "Extensive and Divergent Circadian Gene Expression in Liver and Heart." *Nature* 417 (6884).
- *Stratmann, Markus, and Ueli Schibler. 2006. "Properties, Entrainment, and Physiological Functions of Mammalian Peripheral Oscillators." *Journal of Biological Rhythms*.
- Suburo, A. M., and A. Pellegrino de Iraldi. 1969. "An Ultrastructural Study of the Rat's Suprachiasmatic Nucleus." *Journal of Anatomy* 105 (Pt 3).
- *Takahashi, Joseph S. 2004. "Finding New Clock Components: Past and Future." *Journal of Biological Rhythms*.
- *Vitaterna, Martha Hotz, Joseph S. Takahashi, and Fred W. Turek. 2001. "Overview of Circadian Rhythms." *Alcohol Research and Health* 25 (2).

- *Wolburg, Hartwig, and Andrea Lippoldt. 2002. "Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier: Development, Composition and Regulation." *Vascular Pharmacology* 38 (6).
- Xie, Lulu, Hongyi Kang, Qiwu Xu, Michael J. Chen, Yonghong Liao, Meenakshisundaram Thiyagarajan, John O'Donnell, et al. 2013. "Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain." *Science* 342 (6156).
- Yamazaki, Shin, Rika Numano, Michikazu Abe, Akiko Hida, Ri Ichi Takahashi, Masatsugu Ueda, Gene D. Block, Yoshiyuki Sakaki, Michael Menaker, and Hajime Tei. 2000. "Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats." *Science* 288 (5466).
- Yoo, S.-H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Siepka, et al. 2004. "PERIOD2::LUCIFERASE Real-Time Reporting of Circadian Dynamics Reveals Persistent Circadian Oscillations in Mouse Peripheral Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (15).
- Zhang, Shirley L., Nicholas F. Lahens, Zhifeng Yue, Denice M. Arnold, Peter P. Pakstis, Jessica E. Schwarz, and Amita Sehgal. 2021. "A Circadian Clock Regulates Efflux by the Blood-Brain Barrier in Mice and Human Cells." *Nature Communications* 12 (1).
- Zhang, Shirley L., Zhifeng Yue, Denice M. Arnold, Gregory Artiushin, and Amita Sehgal. 2018. "A Circadian Clock in the Blood-Brain Barrier Regulates Xenobiotic Efflux." *Cell* 173 (1).

Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou (*).